

学校编码: 10384  
学号: 20120051302118

分类号\_\_\_\_密级\_\_\_\_  
UDC\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

乙型肝炎病毒突变型表面抗原在杆状病毒  
表达系统中的表达、纯化及其免疫活性研究

The Expression, Purification and Immunocompetence  
Research of a Mutational HBsAg in the Baculovirus  
Expression System

杨炳春

指导教师姓名: 罗文新

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 07 月 日

论文答辩时间: 2008 年 08 月 日

学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: 曾 定 教授  
评 阅 人: \_\_\_\_\_

2008 年 08 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

## 摘 要

乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus, HBV）是严重危害人类公共健康的世界性问题。在我国，HBV 携带者约占人口总数的 10%，现患慢性乙型肝炎约 3000 万人。HBV 的感染不仅能够引起急、慢性病毒性肝炎，而且部分感染者会发生肝硬化和肝细胞癌。病毒的基因变异与逃避机体免疫应答、出现耐药性、改变致病性和引起疾病流行等密切相关，研究病毒的基因变异对防治 HBV 感染有重要意义。乙型肝炎病毒 S 基因编码的 HBsAg 是当前乙肝疫苗的主要成分，也是 HBV 感染诊断的重要依据。抗-HBs 抗体可用来预防肝移植后 HBV 的再感染和母婴垂直感染，但这有赖于 HBsAg 与抗-HBs 抗体之间的相互作用。当 HBsAg 抗原性发生改变可直接影响 HBV 感染后的诊断和治疗。目前所知，S 基因突变发生率最高的部位是表面抗原中第 145 位氨基酸（基因 nt587G→A）的甘氨酸→精氨酸的突变(G145R)。这种新的变异株可导致疫苗免疫失败、肝脏移植后 HBV 再感染和母婴垂直传播等，给乙肝防治带来了新的问题。现有 HBsAg 诊断试剂对 G145R 突变株感染病例的灵敏度不高，经常会有漏检案例导致误诊和血源性 HBV 传播。

本论文研究从一份献血员血清中分离到一株 G145R 突变的 HBV 病毒 X119，设计 S 区引物从中扩增出 S 基因，利用杆状病毒表达系统进行变异型表面抗原（119s）的大规模表达。通过液相色谱和 CsCl 平衡梯度离心等手段对目的蛋白进行纯化，获得纯化的 119s 经透射电镜观察证明其可自发组装成病毒样颗粒。为考察表达的重组抗原的免疫原性，本研究用纯化后的 119s 抗原免疫小鼠，结果经 119s 免疫的小鼠产生了针对 119s 强烈的特异性免疫应答，而阴性对照组则无特异抗体产生，证明颗粒性的 119s 蛋白具有良好的免疫原性，可见重组杆状病毒表达系统表达生产的突变型 sAg 有望作为新乙肝疫苗的组成成分以提供对 G145R 突变株的保护。对纯化蛋白的抗原性分析发现其与野生型 sAg 对构象型单抗反应性差异显著，表明两者在构象上有很大不同，导致其对部分现有检测试剂的敏感度不高而易被漏检，利用基因工程重组抗原作为开发新检测试剂的筛选原料有望提高检测试剂对突变型 HBV 的检出率。

**关键词：**乙型肝炎病毒；S 基因突变；杆状病毒表达系统

## Abstract

Hepatitis B virus (HBV) is a serious worldwide public health problem. In China, HBV carriers account for 10% of total population and there are about 30 million people suffered from chronic hepatitis. In addition to causing acute hepatitis or chronic hepatitis, HBV often eventually lead to cirrhosis and hepatocellular carcinoma in some patient. Genetic mutation in viruses are usually associated with escape of host immune responses, developing drug resistance, modification of virulence and patterns of epidemiology of diseases. Therefore, study on viral mutations are of great importance in prophylaxis and therapy of HBV. S gene encoded HBsAg is the major component of hepatitis B vaccine, and it is also the most diagnostic evidence of HBV infection. Hepatitis B immunoglobulin could be used to protect the patient from reinfection after liver transplantation, but this effect rely on the interaction of HBsAg and anti-HBs. Therefore, the change of antigenicity of HBsAg has a direct impact on the diagnosis and therapy of HBV. It's well known that the most common mutation at aa145 where glycine is substituted by arginine(G145R) will result in the failure of HBV vaccination, transplantation protection, and vertical transmission protection.

In this study, we isolate a G145R mutant (X119) from serum of a blood donor, amplify its S gene with PCR method and clone into a recombinant baculovirus vector for mass production of this variant HBsAg (119s). The protein is purified by HPLC and CsCl equilibrium centrifugation. Transmission electron microscopy investigation indicates that the purified 119s could form virus like particles autonomously. In order to investigate the immunogenicity of the recombinant antigen, we use purified 119s to immune mice and detect intense immune response and specific antibody generation compared to control group. Above all, the variant HBsAg produced by recombinant baculovirus vector system may be used as a new component of HBV vaccine to provide protection against G145R mutant strain. Structure analyses indicate that the variant HBsAg exhibits significantly different conformation compared with wildtype HBsAg and this may contribute to the insensitive of current diagnostic agent in

detecting variant strain of HBV. New diagnostic agent contained recombinant variant antigen may help promote the detection rate of variant HBV.

**Keywords:** Hepatitis B virus; S gene mutation; Baculovirus expression vector system

厦门大学博硕士论文摘要库

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
<b>第一章 前言.....</b>	<b>1</b>
<b>一. 乙型肝炎病毒研究进展.....</b>	<b>1</b>
1 HBV 的形态及理化性质.....	1
2 HBV 的基因组和主要功能蛋白.....	2
3 HBV 的变异性及分子进化.....	4
4 乙型肝炎的诊断.....	5
5 乙型肝炎疫苗的研制.....	6
<b>二. 昆虫细胞杆状病毒表达载体系统.....</b>	<b>9</b>
1 杆状病毒的生物学特性.....	9
2 杆状病毒表达系统的研究进展.....	10
<b>三. 本论文研究的目的和意义.....</b>	<b>17</b>
<b>第二章 材料与方法.....</b>	<b>18</b>
<b>一. 材料.....</b>	<b>18</b>
1 主要仪器.....	18
2 主要试剂和材料.....	19
3 常用溶液及培养基配制.....	22
<b>二. 方法.....</b>	<b>25</b>
1 基因克隆的构建.....	25
2 昆虫细胞培养和重组杆状病毒的生产.....	28
3 重组蛋白质的表达和纯化.....	29
4 免疫实验.....	31
5 计算机辅助设计与分析.....	33
<b>第三章 结果与分析.....</b>	<b>34</b>
<b>一. 突变型 HBV 表面抗原(119s)的表达.....</b>	<b>34</b>
1 重组杆状病毒 Bv-119s 的构建和生产.....	34
2 重组蛋白在悬浮 Sf-21 细胞中的小量表达实验.....	37
3 利用细胞发酵系统进行目的蛋白的表达.....	39
<b>二. 突变型 HBV 重组抗原(119s)的纯化.....</b>	<b>40</b>
1 119s 的溶解.....	40
2 阴离子交换作用层析.....	42
3 疏水作用层析.....	43

4 氯化铯平衡梯度离心.....	44
5 电镜观察.....	46
<b>三. 重组突变型 HBV 表面抗原(119s)的免疫活性分析.....</b>	<b>46</b>
1 119s 纯化蛋白对抗 HBsAg 单抗的反应性分析.....	46
2 119s 蛋白免疫原性分析.....	49
<b>第四章 讨论.....</b>	<b>51</b>
1 表面抗原突变株对乙肝防治的影响.....	51
2 重组乙肝疫苗的免疫保护性评价.....	51
3 昆虫细胞大规模发酵培养.....	52
4 119s 蛋白的纯化探索.....	53
<b>小结与展望.....</b>	<b>54</b>
<b>参考文献.....</b>	<b>55</b>
<b>致谢.....</b>	<b>65</b>
<b>在校期间发表的论文.....</b>	<b>66</b>



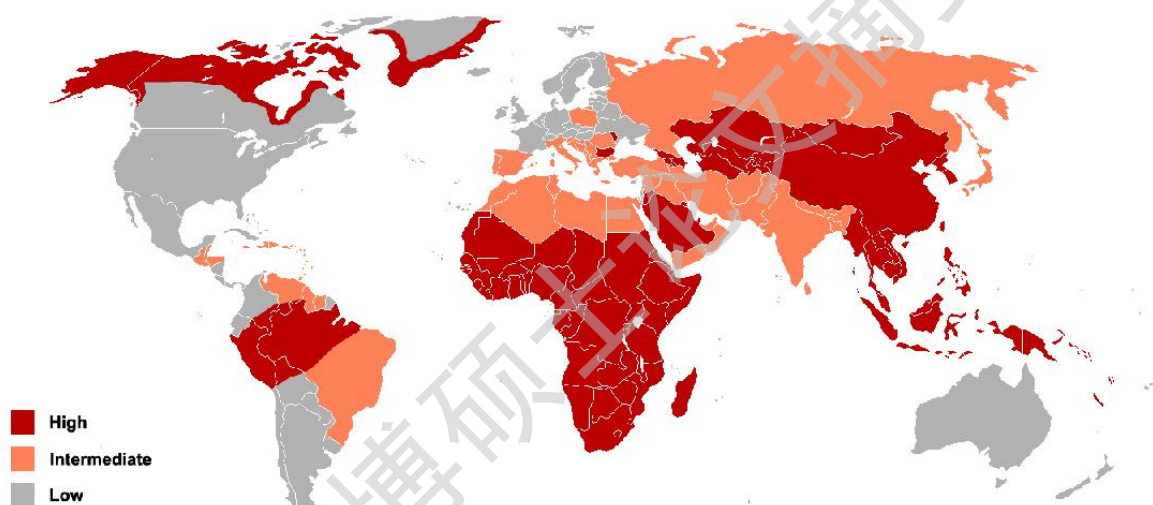
# Content

<b>Abstract.....</b>	<b>II</b>
<b>Chapter I preface.....</b>	<b>1</b>
<b>一. Advanced of hepatitis B virus.....</b>	<b>1</b>
1 Biological characteristic of HBV.....	1
2 The genome and protein of HBV.....	2
3 Aberrance and molecular evolution of HBV.....	4
4 The diagnosis of hepatitis B.....	5
5 Vaccine research of HBV.....	6
<b>二. The baculovirus expression vector system.....</b>	<b>9</b>
1 Biological characteristic of baculovirus.....	9
2 Advanced of BEVS.....	10
<b>三. Purpose and significance of this study.....</b>	<b>17</b>
<b>Chapter II Materials and methods.....</b>	<b>18</b>
<b>一. Materials.....</b>	<b>18</b>
<b>二. Methods.....</b>	<b>25</b>
<b>Chapter III results and analysis.....</b>	<b>34</b>
<b>一. Expression of 119s.....</b>	<b>34</b>
<b>二. Purification of 119s.....</b>	<b>40</b>
<b>三. Immunity analysis of 119s.....</b>	<b>46</b>
<b>Chapter IV discussion.....</b>	<b>51</b>
<b>Brief Summary and Prospect.....</b>	<b>54</b>
<b>Reference.....</b>	<b>55</b>
<b>Acknowledgement and Appendix.....</b>	<b>65</b>

# 第一章 前言

## 一、乙型肝炎病毒研究进展

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)可引起人类的急性或慢性乙型肝炎,而且与肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生有着十分密切的关系。流行病学资料表明,HBV 感染呈世界性的分布,目前全世界至少有 20 多亿人感染过 HBV 病毒,其中有 3.5 亿或 5%的世界人口为慢性感染,而且主要分布在我国、东南亚和非洲地区(图 1)<sup>[1,2]</sup>。慢性感染者中 40%可能发生肝细胞癌,是正常人群的 100—200 倍。全世界每年因此而死亡的人数超过 110 万<sup>[3]</sup>。



图片来源: WHO 2005 年 HBV 流行分布图, 2005 年。

图 1.HBV 感染全球流行图

Fig.1:Global distribution of hepatitis B virus infection

我国 HBV 携带者约占总人口的 10%, 总数超过 1.2 亿, 其中慢性乙型肝炎(CHB)患者约 2.8~3 千万。约 1/4 的 CHB 患者会发展为肝硬化, 部分患者还可进一步发展为肝癌<sup>[3]</sup>。我国每年有近 30 万人死于肝炎或肝癌, 在肝细胞癌患者中, 有 80%病例是 HBV 感染者<sup>[4,5]</sup>。

基因工程乙肝疫苗的广泛使用以及对血液、血制品进行 HBV 的筛检大大缓解了 HBV 感染给人类带来的压力, 但疫苗无应答者的出现和 HBV 的变异等不定因素的存在, 尤其是在治疗和预防乙肝过程中出现的不同种类的 HBV 变异给乙肝的防治带来了新的问题。

### 1 HBV的形态及理化性质

HBV 属嗜肝 DNA 病毒科(Hepadnaviridae), 完整病毒直径 42nm, 又称 Dane 颗粒。Dane 颗粒由核心及外壳两部分组成。核心颗粒直径 27nm, 内含环状不完全双链 DNA 和多聚酶, 其外是脂蛋白外膜(图 2)。脂蛋白外膜约含 30%的脂类和 70%的蛋白质<sup>[6]</sup>。在 HBV 感染者血液中, HBV 可能存在以下三种颗粒结构: Dane 颗粒(具 LHBs, MHBs 和 SHBs, core particle, HBV-DNA); 管形颗粒(具 LHBs, MHBs 和 SHBs); 小球形颗粒(仅具有 MHBs 和 SHBs), 三者的大致摩尔比为 1: 100: 100000<sup>[7]</sup>。

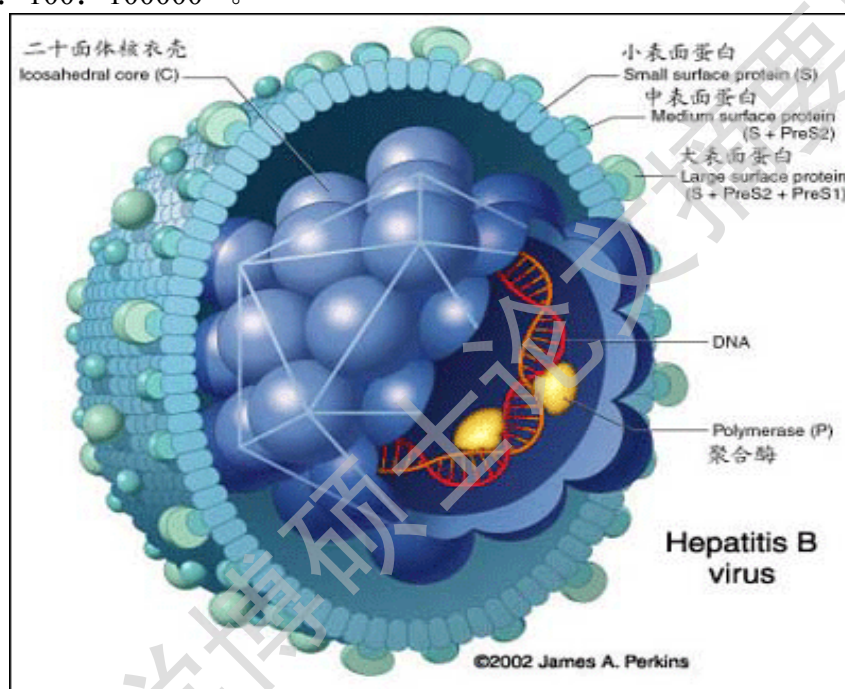


图 2.HBV 形态模拟图  
Fig.2.The structure of HBV

## 2 HBV的基因组和主要功能蛋白

1963 年 Blumberg 等<sup>[8]</sup>首次发现澳大利亚抗原 (Australian antigen), 发现其与乙型肝炎 (HB) 相关, 随后被称为乙型肝炎病毒 (HBV), 1970 年 Dane 等<sup>[9]</sup>通过免疫电镜首次直接观察到 HBV 病毒粒子, 称为 Dane 颗粒。HBV 是已知最小的真核细胞 DNA 病毒, 基因组为一全长约 3200bp 的环状 DNA (图 3)。HBV DNA 双链为不完全双链, 全长负链编码 4 个重叠的开放阅读框: S、C、P 和 X, 分别编码膜蛋白、核壳蛋白、聚合酶和 X 蛋白<sup>[10,11]</sup>。其中外膜蛋白和核壳蛋白为结构蛋白, 用于组装病毒颗粒; 聚合酶和 X 蛋白为功能蛋白, 用于病毒的复制过程。

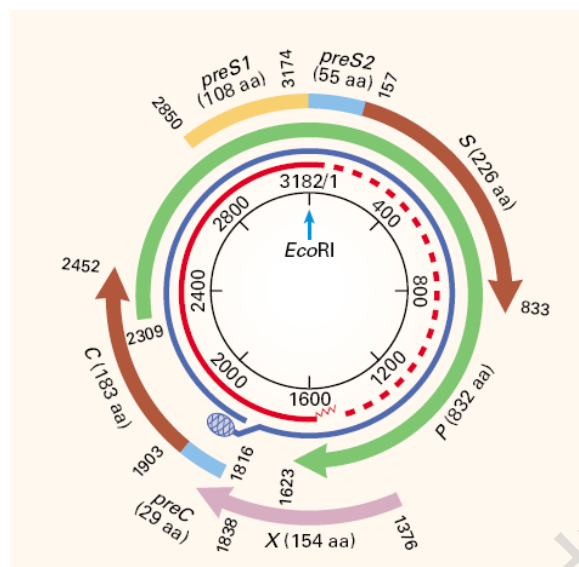


图 3. HBV 病毒基因组结构<sup>[12]</sup>  
Fig. 3. Genome organization of HBV

## 2.1 外膜蛋白

由 S 开放阅读框编码的膜蛋白包含三种组分：大蛋白 (Large protein, LHBs)、中蛋白 (Middle protein, MHBs) 和主 (小) 蛋白 (Major or small protein, SHBs)，三种蛋白由不同的转录本翻译而来。LHBs 由 SP1 启动子转录的 2.4kb 转录物翻译，包含 preS1、preS2 和 HBsAg；MHBs 和 SHBs 由 SP2 启动子转录的 2.1kb 转录物翻译，MHBs 包含 preS2 和 HBsAg；SHBs 即 HBsAg，由 226 个氨基酸组成<sup>[3, 13]</sup>。HBsAg 是 HBV 感染检测的主要血清学标志物，也是 HBV 亚型分类的主要依据。根据 HBsAg 121-160 位氨基酸的组成，将 HBV 分为四种主要的血清型：adw、adr、ayw 和 ayr，“a”为位于 139-147 的共同抗原决定簇，即 a 表位，具有高度免疫原性和序列保守性。一般认为，乙型肝炎疫苗诱导产生或患者恢复期产生的抗-HBs 及其他中和性抗体主要是针对 HBsAg 的“a”决定簇，能够预防中和各亚型的乙肝病毒感染。我国 HBV 流行主要为 adr 和 adw 亚型。

外膜蛋白具有 B 和 T 细胞表位，是宿主保护性免疫的主要免疫原。主蛋白 HBsAg 并不含主要的肝细胞膜受体结合位点，但抗 HBs 的抗体 HBsAb 对乙肝病毒有很强的中和作用。由于对 HBsAg 的抗体应答对宿主具保护作用，故预防性疫苗，包括血源疫苗和重组疫苗的主要成分均为 HBsAg。

## 2.2 核壳蛋白

HBV 核壳蛋白有 HBeAg 和 HBcAg 两种。HBV C 基因通过前后两个 ATG 密码分为前 C 区和 C 区, 由前 C-ATG 起始合成的 212 个氨基酸的前 C/C 蛋白 P25 是 HBeAg 的前体。前体在内质网中信号肽被切除成为中间产物 P22。P22 在细胞腔膜系统中被细胞蛋白酶剪切为各种长短不一的羧基末端, 形成 P15-18, 成为血液中的 HBeAg。HBeAg 是一种可溶性蛋白, 在血清中以二聚体存在。HBeAg 调节免疫发病机制, 分泌 HBeAg 引起免疫耐受。由 C-ATG 起始合成的 HBcAg, HBcAg 由约 183 个氨基酸组成, 分子量约 21kD, 可自行装配成 27nm 直径的颗粒。在 HBV 感染细胞中, 合成的 HBcAg 包裹 HBV DNA 形成核心颗粒。HBcAg 具有高度的免疫原性, 是一种胸腺依赖性抗原, 又是一种非胸腺依赖性抗原, 其诱导 B 细胞、T 辅助 (Th) 细胞和细胞毒性 T (CTL) 细胞的免疫应答最强烈, 几乎所有的 HBV 感染者都会产生抗 HBc (HBcAb) 抗体<sup>[14]</sup>。

### 3 HBV 的变异性及分子进化

乙型肝炎病毒(HBV)在复制中由于存在逆转录过程, 因而较其它病毒更容易发生突变<sup>[15]</sup>。这种突变可以发生于 HBV 的每一个基因区, 以致使乙型肝炎病原学检测结果多样化、临床表现复杂化和抗 HBV 治疗困难化。

**S 基因区变异** 最先和报道最多的 S 基因点突变是第 587 位核苷酸的鸟嘌呤被腺嘌呤替代, 结果导致 aa145 位点由甘氨酸变成了精氨酸, 由于后者带较大电荷, 从而改变了 a 决定簇的外袞构型, 形成具有感染性但不能被中和抗体所识别的“免疫逃避变异株”, 从而出现免疫后又被 HBV 感染的现象。现在发现 S 基因变异的区域主要集中在“a”决定簇 AA124~147 中, 由于某位点氨基酸残基发生改变, 而造成其空间结构和免疫原性的改变。在“a”决定簇的其他位点如 125、127、130、131、137、139、144 处均有产生变异的报道<sup>[16,17,18,19,20]</sup>。

**C 基因区变异** C 基因区包括前 C 基因和 C 基因。前 C 基因的突变影响 HBe 抗原的表达, 最早发现和研究最多是 1896 位的突变, 1989 年 Carman 等<sup>[21]</sup>首次在乙肝患者 HBV 基因组中, 发现前 C 区核苷酸 1896 鸟嘌呤 (G) → 腺嘌呤 (A) 的变异, 使密码子色氨酸变为终止密码子, 导致前 C 蛋白翻译终止, 从而使 HBe 抗原不能合成。前 C 基因的突变还有第 1899 和 1909 位核苷酸的突变。C 基因所编码的 HBcAg 是细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 识别的靶抗原。CTL 能够识别和清除被 HBV 感染的肝细胞<sup>[22]</sup>。HBV 可以通过 C 区及前 C 区的基

因变异来逃避细胞毒性 T 淋巴细胞的攻击。其他 C 区基因的变异主要集中在第 48~60、84~101 位核苷酸区域。研究表明, C 基因和前 C 区基因的变异, 与慢性乙型肝炎的产生密切相关, 是引起乙型肝炎患者病情发生变化的重要原因之一<sup>[23]</sup>。

**X 基因区变异** HBV 的 X 蛋白是由 X 基因编码的转录激活蛋白, 目前已发现有几个与 X 蛋白免疫表达有关的突变热点。第一类是在第 1770~1777 位 8 个碱基的缺失, 影响核心基因启动子和增强因子 II, 产生翻译终止密码, 导致 HBV DNA 复制和蛋白表达的抑制, 最终使免疫学标记阴转。另一类突变如 C→T (核苷酸 1655), A→T (核苷酸 1764) 和 G→A (核苷酸 1766) 似乎与重症肝炎有关<sup>[24]</sup>。HBV 的 X 蛋白在 HBV 感染的细胞及肝炎、肝硬化、肝癌等的形成中对病毒的复制起着重要作用<sup>[25]</sup>。

**P 基因区变异** P 基因区编码产物是 HBV DNA 聚合酶。P 基因的变异通常表现为 YMDD 基序的变异, 它是 HBV 逆转录酶的活性部分, 序列高度保守, 主要有两种变异方式, 一种是由于 P 基因 741 位的 G 被 T 取代, 则其编码的 YMDD 基序中的 M 变为 I, YMDD 变为 YIDD, 另外一种方式是 P 基因区第 739 位的 A 被 G 取代, 则其编码的 YMDD 基序中的 M 变为 V, YMDD 变为 YVDD。YMDD 的变异与对拉米夫定耐药性的产生密切相关<sup>[26]</sup>。

根据 HBV 全基因组序列差异程度, 以 8% 的序列差异为分型标准, 目前将 HBV 分为 A ~ H 8 个基因型。HBV 基因型具有地域分布的特性, 并且与临床表征密切相关<sup>[27]</sup>。现有研究表明 HBV 基因型的分布有明显的地区差异。A 型分布地域比较广泛, 但主要集中在西北欧洲地区、北美洲及非洲中部; B 型和 C 型主要分布在包括中国和日本的东亚及东南亚地区; D 型分布最为广泛, 全世界都有发现, 但主要集中在地中海、中东地区和印度; E 型主要分布于非洲; F 型主要集中在美国原驻民和中美洲地区; G 型主要分布于西欧和北美; H 型分布于美国、墨西哥及尼加拉瓜等地<sup>[28]</sup>。我国以 B 型和 C 型为主, 也存在一定的地区差异。北方以 C 型为主, 南方以 B 型为主; D 型见于部分少数民族地区如新疆、西藏及沿海一些区域; A 型、F 型偶有发现, 未见 E 型、G 型、H 型报道<sup>[29]</sup>。

#### 4 乙型肝炎的诊断

目前, HBV 血清标志物 (HBsAg, HBsAb, HBeAg, HBeAb, HBcAb 即俗称“两对半”) 广泛地作为现症 HBV 感染与既往 HBV 感染的常规检测标准。但是, HBV 是一个高变异的病毒, 其突变率高于其他 DNA 病毒约 4 个数量级, 导致常规“两对半”检测的假阴性高发率。并且, 普通“两对半”检测无法判断感染者和患者体内 HBV 复制情况和传染性大小, 常出现可怀疑难解释的结果, 无法从“两对半”指标直接确定检测个体并未感染 HBV。

HBV-DNA 是 HBV 复制的直接指标, 其 PCR 检测 (或斑点杂交) 是 HB 患者和慢性 HBV 携带者感染与传染性判断的金标准。PCR 与斑点杂交均作为 HBV 感染和传染性的直接指标, 比较而言, PCR 较斑点杂交更加敏感, 要求操作人员有一定的分子生物学实验基础, 良好的实验条件, 且操作需极且认真细致。从应用上看, 斑点杂交似乎更适合判断病毒血症与某些临床病症间的相互关系。PCR 仅能检出复制的病毒, 而不能检出原病毒 (即已整合的病毒), 难以表达非复制状态的存在, 并不能代替血清标志物的检测, PCR 繁琐的程序也使得且不太适合大规模的普查或常规使用, 多用于临床发病机制的研究及药物的筛选等 [30,31]。

建立在荧光共振能量传递技术的基础之上的荧光定量 PCR (FQ-PCR) 近年来迅速发展起来, 并已开始临床应用于 HBV 病毒定量检测, 该方法的快速与高灵敏度为临床抗病毒治疗的疗效和携带者传染性大小的判定提供了更有价值的实验结果 [32, 33]。定量 PCR 技术与操作的复杂性, 假阳性的高发率, 单引物 PCR 可能因突变而产生假阳性、易发生检测样品的交叉污染, 昂贵的实验仪器与对操作人员的高要求都大大限制了它的使用, 尤其是在基层医疗单位, 大规模献血员筛查开展 HBV-DNA 的 PCR 定量检测显然是很不现实的。

## 5 乙型肝炎疫苗的研制

HBV 所致的病毒性肝炎, 具有感染性强, 携带率高、流行面广、慢性化倾向严重的特点, 属致癌性病毒。对乙肝患者, 目前尚无特效药物治疗。因此预防和控制 HBV 感染最主要的措施是就是在暴露前接种乙肝疫苗。从 20 世纪 70 年代以来, 乙肝疫苗的研制已经经历了 3 代。

### 5.1 第一代乙肝疫苗——血源性乙肝疫苗

从 70 年代初开始, 人们开始利用无症状带毒 HBsAg 阳性血清制备乙肝疫



苗预防乙肝病毒感染，称为血源性乙肝疫苗，即第一代乙肝疫苗<sup>[34]</sup>。但是这种疫苗的推广应用有限，因为（1）血源价格昂贵，供应量有限，采集困难，随着 HB 疫苗计划免疫工作的实施，无症状带毒者将日益减少，采血更加不易，因而血源疫苗的产量和成本受到原料的限制；（2）在制作血源疫苗时过程复杂冗长，而且必须灭活血清中的活病毒，以防止其它血液传播疾病，特别是 HIV、HCV 的流行，使血源乙肝疫苗在一些国家的使用受到限制；（3）疫苗制成后至少需要 6 个月的保护效果与安全性实验，增加了其生产成本和生产周期<sup>[35]</sup>。然而乙肝血源疫苗的使用，使人们认识到 HBV 主蛋白可以诱导产生良好的保护性抗体，使人们免受 HBV 的感染，为乙肝第二代疫苗的研制打下了良好的基础。

## 5.2 第二代乙肝疫苗——基因工程乙肝疫苗

最早人们研究大肠杆菌表达系统生产重组乙肝疫苗，但在大肠杆菌中表达的融合 HBsAg 蛋白往往不太稳定，或引起对宿主细胞的毒性，抑制大肠杆菌的生长，表达量极低<sup>[36,37,38]</sup>。

在真核表达系统中，乙肝表面抗原分别在酵母、哺乳动物细胞、家蚕等宿主中得到表达。目前，HBV 基因在真核细胞中的表达主要有 4 条途径：

（1）将 S、S<sub>2</sub> 或 S<sub>1</sub> 基因重组质粒转化酵母，用转化酵母细胞株，经发酵生产乙肝疫苗。1981 年，美国科学家 Rutter 首先在酿酒酵母中表达了 rHBsAg。1982 年，Valenzuela 等人在啤酒酵母中表达 HBsAg 获得成功，同年被美国食品与药物管理局（FDA）批准上市。其后葛兰素史克公司在啤酒酵母中表达制成疫苗，1989 年通过 FDA 上市。日本熊木、武田制药、绿十字、盐野义、美国安进等公司的酵母基因工程疫苗先后上市，我国天坛生物技术公司和深圳康泰生物制药公司已从美国 Merck 公司购买重组乙肝疫苗技术进行生产<sup>[39]</sup>。

（2）将 S、S<sub>2</sub> 或 S<sub>1</sub> 基因重组质粒转染哺乳动物细胞（例如中华仓鼠卵巢细胞），用转化细胞株，经动物细胞大规模培养生产乙肝疫苗。哺乳动物细胞表达的 HBsAg 非常接近天然形式，从而使其发展成为乙肝疫苗的一个重要系统。1981 年，法国巴斯德研究所的 Tiollais 和美国西奈山医学中心的 Chrsman 在哺乳动物细胞中成功表达了 HBsAg。法国巴斯德研究所研制的 CHO 细胞重组乙肝疫苗含有两种抗原，对免疫抑制者可能有效。1991 年中国预防医学科学院病毒所联合长春生物制品所等单位在中国仓鼠卵巢细胞（CHO）中表达了 HBsAg



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库